

A und B) in der Herz- und Skelettmuskulatur, so ist hier ein relativ hoher Anteil von Cardiolipin bemerkenswert. Im übrigen herrscht eine so erstaunliche Übereinstimmung bei diesen verschiedenartigen Organen, daß man fast geneigt ist, eine Organspezifität der Glycerinphosphatidzusammensetzung abzulehnen. Betrachtet man aber die Plasmalogene, so ist das Verhältnis Cholin-: Colaminplasmalogen beim Herz etwa 2:1, beim Uterus 1:5 und bei den Nebennieren 1:8. Vor allem zeigt sich, daß unsere eingangs erwähnte Vermutung, die sich durch die Untersuchung der Aldehyde aus den Glycerinphosphatiden ergab, nun bestätigt wurde. Demnach besteht auch bezüglich des Glycerinphosphatid-

musters zwischen Uterusmuskulatur, Skelett- und Herzmuskulatur ein deutlicher Unterschied.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß zwischen dem aus der Plasmalbestimmung der Ausgangssubstanz errechneten Plasmalogenwert ($\text{Plasmal} \times 2,5$) und dem nach der hier beschriebenen Methode gefundenen eine gewisse Diskrepanz herrscht, die noch nicht erklärt werden kann, aber weiter untersucht wird.

Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie unterstützt.

Herrn A. BINCZEK danken wir für seine ausgezeichnete technische Hilfe.

Literatur

- 1a. GRAY, G. M., *Biochem. J.* 77, 82 (1960). — 1b. SCHOGT, J. C. M., P. HAVERKAMP-BEGEMANN und J. H. RECOURT, *J. Lipid Res.* 2, 142 (1961). — 2. WINTERFELD, M. und H. DEBUCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, im Druck. — 3a. GRAY, G. M. und M. G. MACFARLANE, *Biochem. J.* 81, 480 (1961). — 3b. FARQUHAR, J. W., *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 60, 80 (1962). — 4a. KLENK, E. und H. DEBUCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 296, 179 (1954). — 4b. KLENK, E. und H. DEBUCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 299, 66 (1955). — 5. GOTTFRIED, E. L. und M. M. RAPPORT, *J. biol. Chemistry* 2, 329 (1962). — 6. ANSELL, G. B. und S. SPANNER, *J. Neurochem.* 10, 941 (1963). — 7a. DAWSON, R. M. C., *Biochem. J.* 75, 45 (1960). — 7b. DAWSON, R. M. C., N. HEMINGTON und J. B. DAVENPORT, *Biochem. J.* 84, 497 (1962). — 8. FOLCH, J., M. LEES und G. H. SLOANE STANLEY, *J. biol. Chemistry* 226, 497 (1957). — 9. EBERHAGEN, D. und H. BETZING, *J. Lipid Res.* 3, 382 (1962). — 10. FEULGEN, R., W. BOGUTH und G. ANDRESEN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 287, 90 (1951). — 11. KLENK, E. und H. DEBUCH, in: HOLMAN, LUNDBERG, Malkin, *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Pergamon Press, London (1963). — 12. BARTLETT, G. A., *J. biol. Chemistry* 234, 466 (1959). — 13. BÖTTCHER, J. V., C. M. VAN GENT und C. PRIES, *Analytica chim Acta* (Amsterdam) 24, 203 (1961). — 14. MARINETTI, G. V. und E. STOTZ, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 21, 168 (1956). — 15. HACK, M. H. und V. J. FERRANS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 315, 157 (1959). — 16. ROUSER, G., G. V. MARINETTI, R. F. WITTER, J. F. BERRY und E. STOTZ, *J. biol. Chemistry* 223, 485 (1956). — 17. LEA, C. H., D. N. RHODES und R. D. STOLL, *Biochem. J.* 60, 353 (1955). — 18. HANES, C. S. und F. A. ISHERWOOD, *Nature* (London) 164, 1107 (1949). — 19. PRIES, C., *Promotion Leiden* (1965).

Professor Dr. H. Debuch
Physiol.-chem. Institut der Universität
5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52

Enzymatische Untersuchungen über die Glucuronidierung von Östriol beim Menschen

Von K. DAHM und H. BREUER

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und -Biochemie der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. A. Gütemann)

(Eingegangen am 25. Februar 1966)

Es wurde die enzymatische Bildung der 3 isomeren Östriolmonoglucuronide im Dünndarm des Menschen nachgewiesen. Östriol-3-monoglucuronid, Östriol-16 α -monoglucuronid und Östriol-17 β -monoglucuronid wurden papierchromatographisch, durch die IR-Spektren und mit Hilfe mikrochemischer Reaktionen identifiziert. Es werden Angaben über die intracelluläre Verteilung der Östriol-Glucuronyltransferasen gemacht. Die besondere Bedeutung der Glucuronidierung von Östriol in den Positionen 3, 16 α und 17 β im Dünndarm für den enterohepatischen Kreislauf der Östrogene beim Menschen wird besprochen.

The enzymic formation of the 3 isomeric oestriol monoglucuronides was shown to occur in human intestine. Oestriol 3-monoglucuronide, oestriol 16 α -monoglucuronide and oestriol 17 β -monoglucuronide were identified by paper chromatography, by IR spectra and by various microchemical reactions. Details are given about the intracellular distribution of the oestriol glucuronyltransferases. The significance of the glucuronidation of oestriol in positions 3, 16 α and 17 β by the intestine is discussed in relation to the entero-hepatic circulation of oestrogens in man.

Seit den Untersuchungen von MARRIAN und Mitarbeitern (1–4) ist bekannt, daß Östriol — ein wesentliches Endprodukt des Östrogenstoffwechsels beim Menschen — in wasserlöslicher Form als Glucuronid im Urin ausgeschieden wird. Die besondere physiologische Bedeutung der Östriolglucuronid-Fraktion ergibt sich aus der Tatsache, daß ihre Konzentration während der Schwangerschaft auf etwa das 500–1000fache ansteigt.

Während der letzten Jahre ist es gelungen, aus dem Schwangerenurin Östriol-3-monoglucuronid (5), Östriol-16 α -monoglucuronid (6–8) und Östriol-17 β -monoglucuronid (6) zu isolieren. Über den enzymatischen Mechanismus der Bildung dieser 3 isomeren Östriolmonoglucuronide beim Menschen ist bisher kaum etwas bekannt. Nach SLAUNWHITE und Mitarbeitern (9) findet in der Leber des Menschen eine 16 α -Glucuronidierung

von Östriol statt, während GOEBELSMANN und Mitarbeiter (10) eine Umkonjugierung von Östriol-16 α -monoglucuronid zu Östriol-3-monoglucuronid während der Schwangerschaft nachweisen konnten. Im Hinblick auf die besondere Bedeutung des enterohepatischen Kreislaufes für den Stoffwechsel der Östrogene (11) erschien eine genauere Untersuchung der Glucuronidierung von Östriol im Dünndarm des Menschen von Wichtigkeit. Dabei sollte gleichzeitig die Frage geprüft werden, ob der Dünndarm — im Gegensatz zur Leber — über Glucuronyltransferasen verfügt, die zur Bildung von Östriol-3-monoglucuronid und/oder Östriol-17 β -monoglucuronid befähigt sind. Wie im folgenden gezeigt wird, entstehen im Dünndarm des Menschen alle 3 isomeren Östriolmonoglucuronide.

Methodik

Steroide

Östriol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α .17 β -triol] war ein Handelspräparat, [16-¹⁴C]Östriol (spez. Aktivität 12 μ C/ μ Mol) wurde von Dr. R. KNUPPEN, Bonn, zur Verfügung gestellt. Östriol-3-monoglucuronid [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α .17 β -triol-3-yl- β -D-glucopyranuronat] wurde durch Reduktion von biogenetisch gewonnenem 16 α -Hydroxyöstron-3-monoglucuronid [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α -diol-17-on-3-yl- β -D-glucopyranuronat] mit NaBH₄ hergestellt. Östriol-16 α -monoglucuronid [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α -17 β -triol-16 α -yl- β -D-glucopyranuronat] und Östriol-17 β -monoglucuronid [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α .17 β -triol-17 β -yl- β -D-glucopyranuronat] wurden von Dr. A. E. KELLIE, London, zur Verfügung gestellt. Alle Steroide wurden papierchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft.

Gewebe

Alle Versuche wurden mit gesundem menschlichen Dünndarmgewebe durchgeführt, das bei der Anlage gastro-intestinaler Anastomosen erhalten wurde. Die Zeit zwischen der Gewebesenahme und dem Beginn der Aufarbeitung betrug 5–10 Min.

Zellfraktionierung

Die Dünndarmmucosa wurde nach sorgfältiger Abpräparation der Submucosa in 0,25 M Rohrzuckerlösg. in einem Homogenisator nach BÜHLER (Fa. E. Bühler, Tübingen) bei 0° homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Abtrennung der „Kernfraktion“ zunächst für 15 Min. bei 1000 \times g in einer „Spinco-Zentrifuge L 50“ zentrifugiert. Anschließend wurde der 1000 \times g Überstand 45 Min. bei 20000 \times g zentrifugiert und das Sediment (S-1; enthaltend die Mitochondrien-Fraktion und die „schwere“ Mikrosomen-Fraktion) vom Überstand (Ü-1; enthaltend die „leichte“ Mikrosomen-Fraktion und das Cytoplasma) getrennt. S-1 wurde in Rohrzuckerlösg. resuspendiert und 30 Min. bei 10000 \times g zentrifugiert. Das Sediment (enthaltend die Mitochondrien-Fraktion) wurde verworfen, während der Überstand (Ü-2; enthaltend die „schwere“ Mikrosomen-Fraktion) 60 Min. bei 20000 \times g zentrifugiert wurde. Die so gewonnenen „schweren“ Mikrosomen waren elektronenoptisch frei von Mitochondrien und wurden lyophilisiert. Der Überstand Ü-1 wurde unter Verwendung eines Titan-Rotors zunächst bei 150000 \times g zentrifugiert und nach Abtrennung des Sedimentes (enthaltend die „leichte“ Mikrosomen-Fraktion) erneut zur Abtrennung der Ribosomen-Fraktion 120 Min. bei 150000 \times g zentrifugiert. Die „leichte“ Mikrosomen-Fraktion wurde lyophilisiert und der partikelfreie 150000 \times g Überstand (Cytoplasma) bei –1° aufbewahrt.

Inkubationsbedingungen

Es wurden jeweils 0,1 μ C [16-¹⁴C]Östriol und 350 μ Mol inaktives Östriol mit (a) der „schweren“ Mikrosomen-Fraktion (enthaltend 3,4 mg Eiweiß), (b) der „leichten“ Mikrosomen-Fraktion (enthaltend 3,5 mg Eiweiß) bzw. (c) der Cytoplasma-Fraktion (enthaltend 13,2 mg Eiweiß) und 4,0 mg Uridin-5'-diphosphatglu-

ronsäure (98%, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) in 3,0 ml eines 0,15 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7,4) 60 Min. bei 37° in einem Schüttelthermostaten unter Luft inkubiert.

Extraktion und Aufarbeitung

Nach Abtrennung von nichtglucuronidiertem Östriol und Ausfällung des Enzymeiweißes mit Äthanol wurden die Östriolmonoglucuronide aus den eiweißfreien, wäbr. Phasen mit n-Butanol extrahiert (Einzelheiten siehe (12)).

Papierchromatographie

Alle Versuche wurden bei 25° durchgeführt. Freies Östriol wurde auf formamidimprägniertem Papier mit Chloroform chromatographiert. Zur Trennung der 3 isomeren Östriolmonoglucuronide wurde das System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan (6:14:5:15) verwendet. Eine einwandfreie Trennung der 3 isomeren Östriolmonoglucuronide läßt sich nur dann erreichen, wenn das Papier, mit dem der Trog zum Zwecke der Äquilibrierung allseitig ausgekleidet wird, mit der wäbr. Phase durchtränkt ist. Die Lokalisierung der Östriolmonoglucuronide erfolgte durch Messung der Radioaktivität und Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten mit denjenigen von authentischen Referenzsubstanzen. Die Darstellung der phenolischen Metaboliten erfolgte mit *Folin-Ciocalteu*-Reagenz (13).

Qualitative Reaktionen zur Identifizierung

Die Aufnahme von Infrarotspektren erfolgte mit der KBr-Mikrotechnik (KBr-Pressling 1 \times 5 mm) im Bereich von 2–16 μ am Infrarot-Spektralphotometer „IR-8“ der Fa. Beckman. Zur Reinigung wurden die zu untersuchenden Verbindungen an einer Celite-Säule (Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan (6:14:3:17)) chromatographiert. Die Hydrolyse der Östriolmonoglucuronide wurde bei pH 5,4 mit einem Extrakt aus *Helix pomatia* durchgeführt; das nach Hydrolyse freigesetzte Östriol wurde nach BROWN (14) methyliert, der Methyläther an einer Al₂O₃-Säule rechromatographiert und mit der Kober-Reaktion nach NOCKE (15) bestimmt (Einzelheiten siehe (12)). Die Messung der Radioaktivität im Verlaufe der Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität von [16-¹⁴C]Östriol erfolgte jeweils in 5 ml einer Scintillations-Lösung (enthaltend 5 g/l 2,5-Diphenyloxazol [PPO] und 0,3 g/l 1,4-bis 2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol [Dimethyl-POPOP]) mit Hilfe eines Tricarb-Scintillations-Spektrometers Modell 3003 der Fa. Packard mit externem Standard; die Zählausbeute für ¹⁴C beträgt 81%.

Quantitative Bestimmungen

Die quantitative Bestimmung der isomeren Östriolmonoglucuronide erfolgte nach Papierchromatographie durch Auszählung der Radioaktivität auf 3 cm breiten und 50 cm langen Papierstreifen mit einem Radiopapierchromatographen Modell 7201 der Fa. Packard, ausgerüstet mit einem fensterlosen Helium-Butan-Durchflußzähler (4 π -Zählgeometrie) und einem Integrator. Die Zählausbeute für ¹⁴C beträgt 27%; weitere Einzelheiten zur Radiopapierchromatographie von Steroiden vgl. (16). Die Stickstoffbestimmungen erfolgten nach *Kjeldahl*.

Ergebnisse

Identifizierung der isomeren Östriolmonoglucuronide

Nach Inkubation von 0,1 μ C [16-¹⁴C]Östriol und 350 μ Mol Östriol mit der „leichten“ Mikrosomen-Fraktion in Gegenwart von Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure wurden 3 wasserlösliche Metaboliten (A-1, A-2 und A-3) nachgewiesen, die sich papierchromatographisch im System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan gut voneinander trennen ließen (Abb. 1). Die Wanderungsgeschwindigkeiten der 3 Metaboliten stimmten mit denjenigen von Östriol-3-monoglucuronid (A-1), Östriol-16 α -monoglucuronid (A-2) und Östriol-17 β -monoglucuronid (A-3) überein. Zur weiteren Identifi-

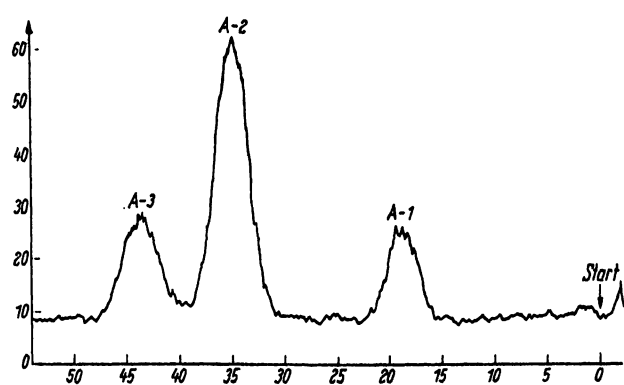


Abb. 1

Radiopapierchromatogramm der nach Inkubation von $0,1 \mu\text{C}$ $[16-^{14}\text{C}]$ Östrial und $350 \mu\text{Mol}$ Östrial mit der „leichten“ Mikrosomen-Fraktion des menschlichen Dünndarmes in Gegenwart von Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure entstandenen Metaboliten A-1, A-2 und A-3.

Papierchromatographisches System: Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan (6:14:5:15); Laufzeit 20 Stdn. Die Aufzeichnung des Radiopapierchromatogramms erfolgte mit einem „Linecomb-Schreiber“ der Fa. Hartmann und Braun. A-1: Östrial-3-monoglucuronid; A-2: Östrial-16 α -monoglucuronid; A-3: Östrial-17 β -monoglucuronid.

Abszisse: Laufstrecke in cm.

Ordinate: Impulse/Min. (Meßbereich 1×10^3)

zierung wurden die Metaboliten von den Papierchromatogrammen mit Methanol eluiert und im einzelnen folgende Reaktionen durchgeführt.

A-1 wurde im System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan rechromatographiert (Wanderungsgeschwindigkeit 19 cm/20 Stdn.) und ergab mit *Folin-Ciocalteu* Reagenz keine Blaufärbung. Nach Behandlung von A-1 mit Dimethylsulfat konnte keine Methylierung nachgewiesen werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen werden durch Dimethylsulfat nur phenolische, nicht aber alkoholische Hydroxylgruppen methyliert (vgl. 14); aus dem negativen Ausfall des Methylierungsversuches geht also hervor, daß der Metabolit A-1 keine freie phenolische Hydroxylgruppe besitzt. Nach Hydrolyse von A-1 mit β -Glucuronidase wurde Östrial sowohl papier- als auch säulenchromatographisch als Aglykon nachgewiesen. Auf Grund dieser Ergebnisse handelt es sich bei „A-1“ um Östrial-3-monoglucuronid. Nach Rechromatographie von A-2 im System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan (Wanderungsgeschwindigkeit 35 cm/20 Stdn.) ergab die Verbindung

mit *Folin-Ciocalteu*-Reagenz eine Blaufärbung. Das IR-Spektrum von A-2 war mit demjenigen von Östrial-16 α -monoglucuronid identisch. Nach Hydrolyse von A-2 mit β -Glucuronidase wurde Östrial sowohl papier- als auch säulenchromatographisch als Aglykon nachgewiesen; außerdem wurde $[16-^{14}\text{C}]$ Östrial als Triacetat aus Benzol zur konstanten spezifischen Aktivität kristallisiert. Aus diesen Befunden geht hervor, daß A-2 mit Östrial-16 α -monoglucuronid identisch ist.

A-3 zeigte bei der Rechromatographie im System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan eine Wanderungsgeschwindigkeit von 44 cm/20 Stdn. und ergab ebenfalls mit *Folin-Ciocalteu*-Reagenz eine Blaufärbung. Das IR-Spektrum von A-3 stimmte mit demjenigen von authentischem Östrial-17 β -monoglucuronid überein. Hydrolyse von A-3 mit β -Glucuronidase führte zur Freisetzung von Östrial, das papier- und säulenchromatographisch sowie durch Kristallisation als $[16-^{14}\text{C}]$ Östrialtriacetat zur konstanten spezifischen Aktivität identifiziert wurde. Demnach handelt es sich bei A-3 um Östrial-17 β -monoglucuronid.

Intrazelluläre Lokalisierung der Bildung der isomeren Östrialmonoglucuronide.

Die Bildung der 3 isomeren Östrialmonoglucuronide erfolgte in den einzelnen Zellfraktionen in unterschiedlichem Ausmaß. Wie aus den Werten der Tabelle 1 hervorgeht, wurde Östrial-3-monoglucuronid sowohl in der „leichten“ als auch in der „schweren“ Mikrosomen-Fraktion in etwa gleichem Umfange gebildet; dagegen konnte diese Verbindung in der Cytoplasma-Fraktion nur in sehr geringem Umfange nachgewiesen werden. Östrial-16 α -monoglucuronid entstand in den beiden Mikrosomen-Fraktionen als Hauptmetabolit, während Östrial-17 β -monoglucuronid vorwiegend in der „leichten“ Mikrosomen-Fraktion und in der Cytoplasma-Fraktion gebildet wurde.

Diskussion

Aus den hier beschriebenen Ergebnissen geht hervor, daß der Dünndarm des Menschen in der Lage ist, alle 3 möglichen isomeren Östrialmonoglucuronide zu bilden. Dieser Befund weist auf die besondere Bedeutung des menschlichen Dünndarms für die Glucuronidierung von Östrial hin. Von den im Schwangerenurin gefun-

Tab. 1

Bildung von Östrial-3-monoglucuronid, Östrial-16 α -monoglucuronid und Östrial-17 β -monoglucuronid in verschiedenen Zellfraktionen des menschlichen Dünndarmes.

Es wurden jeweils $0,1 \mu\text{C}$ $[16-^{14}\text{C}]$ Östrial und $350 \mu\text{Mol}$ Östrial inkubiert. Inkubationsbedingungen siehe Methodik. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten durch Messung der Radioaktivität. Die Werte der Tabelle sind Mittelwerte von jeweils 3 Einzelbestimmungen

Zellfraktion	Gebildete Monoglucuronide in $\mu\text{Mol}^{1)}$			Eiweißgehalt der inkubierten Zellfraktionen in mg
	Östrial-3-monoglucuronid	Östrial-16 α -monoglucuronid	Östrial-17 β -monoglucuronid	
„Schwere“ Mikrosomen	40,2	79,7	17,4	3,4
„Leichte“ Mikrosomen	37,5	92,0	50,7	3,5
150000 \times g Überstand	1,4	9,3	57,5	13,2

¹⁾ Alle Werte sind auf Grund von Zusatzversuchen auf 100% Wiederfindung korrigiert.

denen Östriolglucuroniden konnte bisher nämlich nur Östriol-16 α -monoglucuronid als Metabolit in der Leber des Menschen nachgewiesen werden, während über den Bildungsort von Östriol-3-monoglucuronid und Östriol-17 β -monoglucuronid nichts bekannt war. Die Tatsache, daß der menschliche Dünndarm neben Östriol-16 α -monoglucuronid auch Östriol-3-monoglucuronid sowie Östriol-17 β -monoglucuronid synthetisieren kann, läßt die wichtige Rolle erkennen, die dieses Organ neben der Leber bei der Bildung wasserlöslicher Östrogenkonjugate spielt. Auf Grund der hier gewonnenen Ergebnisse können unsere Vorstellungen über die physiologischen Vorgänge beim enterohepatischen Kreislauf der Östrogene erweitert werden. Demnach entsteht in der Leber des Menschen bevorzugt oder ausschließlich Östriol-16 α -monoglucuronid, das über die Galle (17) in den Dünndarm ausgeschieden wird. Offenbar findet in bestimmten Zellen des Dünndarmepithels zunächst eine Hydrolyse des Konjugates statt; das dabei freigesetzte Aglykon wird im weiteren Verlauf der Resorption (18) mit Hilfe einer oder mehrerer Glucuronyltransferasen in Position 3, 16 α bzw. 17 β rekonjugiert. Die so entstandenen 3 isomeren Östriolmonoglucuronide treten in den venösen Kreislauf über und können somit über das Blut durch die Nieren ausgeschieden werden.

Betrachtet man die Biogenese der 3 isomeren Östriolmonoglucuronide im Zusammenhang mit einigen bereits bekannten Reaktionen des Östrogenstoffwechsels (19), so ergibt sich folgendes Bild:

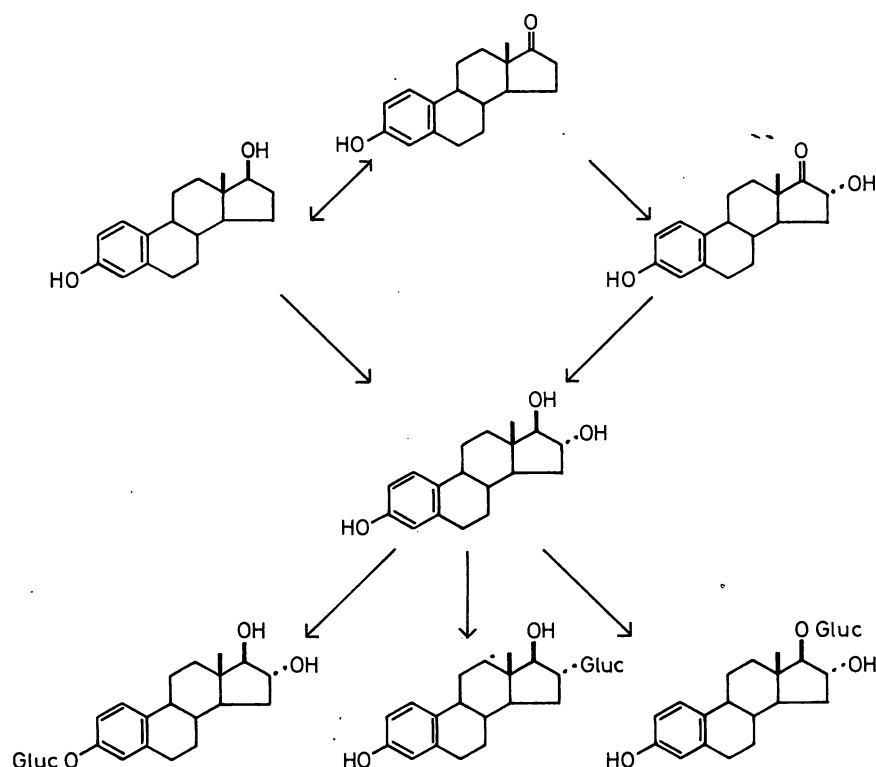
Östron wird zum Teil durch eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase zu Östradiol-17 β reduziert, zum Teil

— wahrscheinlich bevorzugt — durch eine 16 α -Hydroxylase zu 16 α -Hydroxyöstron hydroxyliert. Im Verlaufe weiterer Reaktionen kann Östriol (a) aus Östradiol-17 β durch 16 α -Hydroxylierung sowie (b) aus 16 α -Hydroxyöstron durch Reduktion der 17-Ketogruppe entstehen. Die Bildung der Östriolmonoglucuronide erfolgt dann durch direkte Glucuronidierung von Östriol.

Die Östriol-Glucuronyltransferasen zeigen, wie aus der vorliegenden Untersuchung hervorgeht, eine unterschiedliche zelluläre Verteilung. Offenbar sind mindestens 2 verschiedene Enzymsysteme an der Bildung der Östriolmonoglucuronide beteiligt. So ist die Glucuronyltransferase, welche die phenolische Hydroxylgruppe von Östriol glucuronidiert, fast ausschließlich in der mikrosomalen Fraktion anzutreffen. Im Gegensatz dazu ist die alkoholische Glucuronyltransferase, welche die alkoholische Hydroxylgruppe am C-Atom 17 von Östriol konjugiert (20) in etwa gleicher Aktivität in den Mikrosomen-Fractionen und im 150 000 \times g Überstand vorhanden. Die Östriol-16 α -Glucuronyltransferase des Dünndarmes zeigte die höchste Aktivität der untersuchten Enzyme und ist — wie das entsprechende Enzym der Leber (9) — überwiegend in der Mikrosomen-Fraktion lokalisiert. Die Auftrennung des endoplasmatischen Reticulums in die sog. „leichte“ und „schwere“ Mikrosomen-Fraktion hat für die Östriol-17 β -Glucuronyltransferase deutliche Aktivitätsunterschiede gezeigt. Daraus geht hervor, daß eine Unterteilung der sog. Mikrosomen-Fraktion in Subfraktionen einen besseren Einblick in die Lokalisierung von Enzymmustern innerhalb der Zelle gestattet (vgl. 21).

Die hier beschriebenen Befunde schließen die Möglichkeit nicht aus, daß neben den Östriolmonoglucuroniden auch Di- oder Trigluguronide im Dünndarm des Menschen entstehen; allerdings haben sich für die Bildung von Östriol-Di- oder Trigluguroniden bisher keine Anhaltspunkte ergeben. In diesem Zusammenhang erscheinen zwei Fragen von Wichtigkeit: 1. Ist die weitere Glucuronidierung von Östriolmonoglucuroniden aus sterischen Gründen möglich? 2. Ist eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Östriolmonoglucuronide durch Bildung von Di- und Trigluguroniden überhaupt erforderlich, um das Endprodukt des Östrogenstoffwechsels im notwendigen Umfange aus dem Organismus zu eliminieren? Die Beantwortung dieser Fragen muß das Ziel weiterer Untersuchungen bleiben.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung durchgeführt. Wir danken Fräulein MONIKA LINDLAU für ihre wertvolle Mitarbeit.



Zusammenfassende Darstellung der Bildung der 3 isomeren Östriolmonoglucuronide beim Menschen. Gluc = Glucuronid

Literatur

1. COHEN, S. L. und G. F. MARRIAN, *Biochem. J.* 30, 57 (1936). —
2. COHEN, S. L., G. F. MARRIAN und A. D. ODELL, *Biochem. J.* 30, 2250 (1936). — 3. COHEN, S. L., *J. biol. Chemistry* 184, 417 (1950).
- 4. GRANT, J. K. und G. F. MARRIAN, *Biochem. J.* 47, 1 (1950). —
5. BELING, C. G., *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* 79 (1963). — 6. CARPENTER, J. G. D. und A. E. KELLIE, *Biochem. J.* 84, 303 (1962).
- 7. NEEMAN, N. und Y. HASHIMOTO, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 2972 (1962). — 8. HASHIMOTO, Y. und M. NEEMAN, *J. biol. Chemistry* 238, 1273 (1963). — 9. SLAUNWHITE, W. R. jr., M. A. LICHTMAN und A. A. SANDBERG, *J. Clin. Endocr.* 24, 638 (1964). —
10. GOEBELSMANN, U., K. SJÖBERG, N. WIKSTROM und E. DICZFALUSY, *Acta endocr. (Kbh.)* 50, 261 (1965). — 11. DICZFALUSY, E. und CH. LAURITZEN, *Östrogene beim Menschen*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961). — 12. DAHM, K. und H. BREUER, *Acta endocr. (Kbh.)*, im Druck. — 13. FOLIN, O. und V. CIOCALTEU, *J. biol. Chemistry* 73, 627 (1927). — 14. BROWN, J. B., *Biochem. J.* 60, 185 (1955). — 15. NÖCKE, W. *Biochem. J.* 78, 593 (1961). — 16. BERLINER, D. L., O. V. DOMINGUEZ und G. WESTENSKOW, *Analytic. Chem.* 29, 1797 (1957). — 17. ADLERCREUTZ, H., *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* 72 (1962). — 18. LISBOA, B. P., I. DROSSÉ und H. BREUER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 342, 106 (1965). — 19. BREUER, H., *Vitamins and Hormones* 20, 285 (1962). — 20. DAHM, K. und H. BREUER, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 113, 404 (1966). — 21. HECKER, E. und D. BETZ, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 338, 260 (1964).

Professor Dr. H. Breuer

Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik
53 Bonn-Venusberg

Glykosaminoglykane und Glykosaminoglykano-Hydrolasen in Transplantationstumoren

Von E. BUDDECKE und B. SITTNER

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(Eingegangen am 19. Februar 1966)

Für eine Beziehung zwischen dem infiltrativen Wachstum von Tumoren und ihrem Gehalt an sauren Glykosaminoglykanen (sauren Mucopolysacchariden) und Glykosaminoglykan-hydrolysierenden Enzymen gibt es nur wenige experimentelle Belege. Das *Walker*-Carcino-Sarkom und *Yoshida*-Sarkom der Ratte und das *Ehrlich*sche Ascites-Carcinom der Maus enthalten saure Glykosaminoglykane und Glykoproteine in einer Menge von 0,1–0,2% bzw. 0,7–1,5% bezogen auf das Trockengewicht. Die sauren Glykosaminoglykane bestehen vorwiegend aus Hyaluronat und Chondroitin 4- bzw. 6-sulfat und geringen Anteilen nicht identifizierter z. T. sulfat- und uronsäurehaltiger Glykosaminoglykane. Hyaluronat und Chondroitinsulfat wurden in reiner Form dargestellt und durch Analysen identifiziert. Bezüglich der untersuchten chemischen und physiko-chemischen Eigenschaften bestanden keine Unterschiede zu den sauren Glykosaminoglykanen mesenchymaler Gewebe. In 0,15-proz. Hyaluronatlösung ist die Diffusion von D-Glucose wenig, von Rinderserumalbumin stark verzögert. Die nach proteolytischem Abbau gewonnenen Glykoproteine enthalten neben einem Anteil von 50% Protein bzw. Polypeptid als Zuckerkomponenten Sialinsäure, N-Acetyl-hexosamin, D-Galaktose und D-Mannose.

Im *Walker*-Carcino-Sarkom sind Enzyme vorhanden, die den Abbau saurer Glykosaminoglykane bewirken. Hyaluronat-Glykanohydrolase (E.C.3.2.1.35), N-Acetyl- β -glucosaminidase (E.C.3.2.1.30) und β -Glucuronidase (E.C.3.2.1.31) wurden in z. T. hohen spezifischen Aktivitäten nachgewiesen und durch Ammoniumsulfatfällung und Säulenchromatographie angereichert. Bei synergistischer Wirkung dieser Enzyme wird Hyaluronat bis zu monomeren Spaltprodukten abgebaut, unter denen freies N-Acetyl-glucosamin und Glucuronat isoliert und identifiziert wurden.

There is only limited experimental evidence for a relationship between the infiltrative growth of tumours and their content of acidic glycosaminoglycans (acidic mucopolysaccharides) and glycosaminoglycan-hydrolysing enzymes. On a dry weight basis, the *Walker*-carcino-sarcoma and the *Yoshida*-sarcoma of the rat and the *Ehrlich* Ascites-carcinoma of the mouse contain 0.1–0.2% and 0.7–1.5% respectively of acidic glycosaminoglycans and glycoproteins. The acidic glycosaminoglycans consist chiefly of hyaluronate and chondroitin 4- or 6-sulphate, with small amounts of unidentified glycosaminoglycans, which contain some sulphate and uronic acid. Hyaluronate and chondroitin sulphate were purified and identified by analysis. With regard to the chemical and physical-chemical properties studied, they showed no differences from the acidic glycosaminoglycans of mesenchymal tissue. In 0.15% hyaluronate solution, the diffusion of glucose is slightly retarded but that of bovine serum albumin is strongly retarded. Glycoproteins, obtained by proteolytic degradation, contain 50% of protein or polypeptides, and the sugar components are sialic acid, N-acetyl-hexosamine, D-galactose and D-mannose.

In the *Walker*-carcino-sarcoma, enzymes are present, which catalyse the degradation of acidic glycosaminoglycans. Hyaluronate-glycanohydrolase (E.C.3.2.1.35), N-acetyl- β -glucosaminidase (E.C.3.2.1.30) and β -Glucuronidase (E.C.3.2.1.31) were found, sometimes with high specific activity, and were concentrated by ammonium sulphate precipitation and column chromatography. By the synergistic action of these enzymes, hyaluronate is degraded to monomeric cleavage products, of which free N-acetyl-glucosamine and glucuronate were isolated and identified.

Saure Glykosaminoglykane¹⁾ lassen sich histochemisch

¹⁾ Vorgeschlagener systematischer Name für aminozuckerhaltige Polysaccharide, die pro Disaccharideinheit eine Uronsäure und/oder eine oder mehrere Estersulfatgruppen enthalten. Siehe auch: M. FLORKIN u. E. H. STOTZ, *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 5, Carbohydrates, S. 262ff; Elsevier Publishing Comp. Amsterdam, London, New York, (1963).

in vielen gut- und bösartigen Tumoren epithelialer und mesenchymaler Herkunft nachweisen (1). Ihre Akkumulation an der Grenze zwischen Tumor- und Wirtsgewebe steht mit der Frage einer möglichen Funktion der Tumorglykosaminoglykane als „Permeabilitätsbarriere“ bzw. einer „mesenchymalen Abwehrreaktion“ des Wirts-